

PCT

WELTOORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICH NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(31) Internationale Patentklassifikation 6: C12N 15/12, C07K 14/51, 14/495, A61K 38/18, C07K 16/22	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 95/04819 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 16. Februar 1995 (16.02.95)
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP94/02630</p> <p>(13) Internationales Anmeldedatum: 9. August 1994 (09.08.94)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: P 43 26 829-3 10. August 1993 (10.08.93) DE P 44 18 222-8 25. Mai 1994 (25.05.94) DE P 44 20 157-5 9. Juni 1994 (09.06.94) DE</p> <p>(71) Anmelder: BIOPHARM GESELLSCHAFT ZUR BIOTECHNOLOGISCHEM ENTWICKLUNG VON PHARMAKA MBH (DE/DE); Czernyring 22, D-69113 Heidelberg (DE).</p> <p>(72) Erfinder: HÖTTEN, Gerhard; Weihwiesenweg 17, D-69245 Bammelatal (DE); NEIDHARDT, Helge; Eichenweg 7, D-39041 Marburg (DE); PAULISTA, Michael; Wingerstwiese 10, D-39181 Leinse (DE).</p> <p>(74) Anwälte: WEICKMANN, H. u.w.; Kopernikusstrasse 9, D-81679 München (DE).</p>		<p>(31) Bestimmungsländer: AU, BY, CA, CN, CZ, HU, JP, KR, LT, NZ, RU, SI, UA, VN, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>Veröffentlicht Mit internationalem Recherchebericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</p>

(44) Title: NEW GROWTH/DIFFERENTIATION FACTOR OF THE TGF- β FAMILY(54) Bezeichnung: NEUER WACHSTUMS-/DIFFERENZIERUNGSFAKTOR DER TGF- β -FAMILIE

(57) Abstract

A protein of the TGF- β family is disclosed, as well as the DNA that codes for this protein and a pharmaceutical composition containing this protein.

(57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein Protein der TGF- β -Familie, die dafür codierende DNA und eine das Protein enthaltende pharmazeutische Zusammensetzung.

BEST AVAILABLE COPY

30 29

- 3 -

Faktoren könnten medizinische Anwendung bei der Heilung von Schäden und der Behandlung von degenerativen Erkrankungen der Knochen und/oder anderen Gewebearten, wie etwa z.B. Niere oder Leber, finden..

In der Patentanmeldung PCT/EP93/00350 ist eine Nukleotid- und Aminosäuresequenz für das TGF- β -Protein MP-52 angegeben, wobei die dem reifen Peptid entsprechende Sequenz und ein Großteil der dem Propeptid von MP-52 entsprechenden Sequenz angegeben ist. Die vollständige Sequenz des Propeptids MP-52 wird nicht offenbart.

Die der vorliegenden Erfindung zugrundeliegende Aufgabe besteht darin, DNA-Sequenzen bereitzustellen, die für neue Mitglieder der TGF- β -Proteinfamilie mit mitogenem und/oder differenzierungs-induktiven, z.B. osteo-induktivem Potential codieren. Insbesondere besteht die Aufgabe der vorliegenden Erfindung darin, die vollständige DNA- und Aminosäuresequenz des TGF-Proteins MP-52 bereitzustellen.

Diese Aufgabe wird gelöst durch ein DNA-Molekül, das für ein Protein der TGF- β -Familie codiert und

- (a) den für das reife Protein codierenden Anteil und gegebenenfalls weitere funktionelle Anteile der in SEQ ID NO. 1 gezeigten Nukleotidsequenz,
- (b) eine der Sequenz aus (a) im Rahmen der Degeneration des genetischen Codes entsprechende Nukleotidsequenz,
- (c) einem allelischen Derivat einer der Sequenzen aus (a) und (b) entsprechende Nukleotidsequenz, oder
- (d) eine mit einer der Sequenzen aus (a), (b) oder (c) hybridisierende Sequenz umfaßt

unter der Voraussetzung, daß ein DNA-Moleköl gemäß (d) zumindest den für ein reifes Protein der TGF- β -Familie codierenden Anteil enthält.

Weitere Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung betreffen den Gegenstand der Ansprüche 2 bis 10. Andere Merkmale

- 4 -

und Vorteile der Erfindung gehen aus der Beschreibung der bevorzugten Ausführungsformen und den Zeichnungen hervor. Die Sequenzprotokolle und Zeichnungen werden jetzt kurz beschrieben.

SEQ ID NO.1 zeigt die vollständige Nukleotidsequenz der für das TGF- β -Protein MP-52 codierenden DNA. Das ATG-Startcodon beginnt mit Nukleotid 640. Der Start des reifen Proteins beginnt hinter Nukleotid 1783.

SEQ ID NO.2 zeigt die vollständige Aminosäuresequenz des TGF- β -Proteins MP-52, die aus der in SEQ ID NO.1 gezeigten Nukleotidsequenz abgeleitet wurde.

Figur 1 zeigt einen Vergleich der Aminosäuresequenz von MP-52 mit einigen Mitgliedern der BMP-Proteinfamilie mit Beginn am ersten der sieben konservierten Cysteinreste. * bedeutet, daß die Aminosäure in allen verglichenen Proteinen gleich ist; + bedeutet, daß die Aminosäure in mindestens einem der Proteine im Vergleich zu MP-52 übereinstimmt.

Figur 2 zeigt die Nukleotidsequenzen der Oligonukleotidprimer, die in der vorliegenden Erfindung verwendet wurden, und einen Vergleich dieser Sequenzen mit bekannten Mitgliedern der TGF- β -Familie. M bedeutet A oder C, S bedeutet C oder G, R bedeutet A oder G und K bedeutet G oder T. 2a zeigt die Sequenz des Primers OD, 2b zeigt die Sequenz des Primers OID.

Die vorliegende Erfindung umfaßt zumindest den für das reife Protein codierenden Anteil und gegebenenfalls weitere funktionelle Anteile der in SEQ ID NO.1 gezeigten Nukleotidsequenz sowie Sequenzen, die dieser Sequenz im Rahmen der Degeneration des genetischen Codes entsprechen und allelische Derivate solcher Sequenzen. Weiterhin umfaßt die vorliegende Erfindung auch mit derartigen Sequenzen hybridisierende Sequenzen unter der Voraussetzung, daß ein solches DNA-Mole-

WO 95/04819

- 7 -

tidteil von MP-52 gefunden, während andere Teile des Precursor-
sorteils von MP-52 erhebliche Unterschiede zu BMP-Precursoren
zeigen.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Vektor, der mindestens eine Kopie eines erfindungsgemäßen DNA-Moleküls enthält. In einem derartigen Vektor ist die erfindungsgemäße DNA-Sequenz vorzugsweise operativ mit einer Expressionskontrollsequenz verknüpft. Solche Vektoren eignen sich zur Herstellung von TGF- β -artigen Proteinen in stabil- oder transient-transformierten Zellen. Verschiedene Tier-, Pflanzen-, Pilz- und Bakteriansysteme können zur Transformation und die anschließende Kultivierung verwendet werden. Vorzugsweise enthalten die erfindungsgemäßen Vektoren für die Replikation in der Wirtszelle notwendige Sequenzen und sind autonom replizierbar. Weiterhin ist die Verwendung von Vektoren bevorzugt, die selektierbare Markergene enthalten, wodurch die Transformation einer Wirtszelle nachweisbar ist.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist eine Wirtszelle, die mit einer erfindungsgemäßen DNA oder einem erfindungsgemäßen Vektor transformiert ist. Beispiele von geeigneten Wirtszellen umfassen verschiedene eukaryontische und prokaryontische Zellen, wie etwa E.coli, Insektenzellen, Pflanzenzellen, Säugerzellen und Pilze, wie etwa Hefe.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Protein der TGF- β -Familie, das von einer DNA-Sequenz nach Anspruch 1 codiert wird. Vorzugsweise weist das erfindungsgemäße Protein die in SEQ ID NO.2 gezeigte Aminosäuresequenz oder gegebenenfalls funktionelle Anteile davon auf und zeigt biologische Eigenschaften, wie etwa Gewebe-induktive, insbesondere osteo-induktive oder/und mitogens Fähigkeiten, die möglicherweise für eine therapeutische Anwendung relevant sind. Die oben genannten Merkmale des Proteins können abhängig von der Bildung von Homodimeren oder Heterodimeren variieren. Solche

- 8 -

Strukturen können sich ebenfalls für klinische Anwendungen geeignet erweisen.

Die biologischen Eigenschaften der erfindungsgemäßen Proteine, insbesondere das mitogene und osteo-induktive Potential, können z.B. in Assays gemäß Seyedin et al., PNAS 82 (1985), 2267-2271 oder Sampath und Reddi, PNAS 78 (1981), 7599-7603 bestimmt werden.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung eines Proteins der TGF- β -Familie, welches dadurch gekennzeichnet ist, daß man eine mit einer erfindungsgemäßen DNA oder einem erfindungsgemäßen Vektor transformierte Wirtszelle kultiviert und das TGF- β -Protein aus der Zelle oder/und dem Kulturüberstand gewinnt. Ein solches Verfahren umfaßt die Kultivierung der transformierten Wirtszelle in einem geeigneten Kulturmedium und die Reinigung des erzeugten TGF- β -artigen Proteins. Auf diese Weise ermöglicht das Verfahren die Herstellung einer ausreichenden Menge des gewünschten Proteins zum Einsatz bei der medizinischen Behandlung oder in Anwendungen unter Verwendung von Zellkulturtechniken, bei denen Wachstumsfaktoren benötigt werden. Die Wirtszelle kann ein Bakterium, wie etwa Bacillus oder E.coli, ein Pilz, wie etwa Hefe, eine Pflanzenzelle, wie etwa Tabak, Kartoffel oder Arabidopsis oder eine tierische Zelle, insbesondere eine Wirbeltierzelllinie, wie etwa Mo-, COS- oder CHO-Zelllinien oder eine Insektenzelllinie sein.

Noch ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Bereitstellung von pharmazeutischen Zusammensetzungen, die eine pharmazeutisch wirksame Menge eines erfindungsgemäßen TGF- β -artigen Proteins als Wirkstoff enthalten. Gegebenenfalls umfaßt eine solche Zusammensetzung einen pharmazeutisch akzeptablen Träger-, Hilfe-, Verdünnungs- oder Füllstoff. Eine solche pharmazeutische Zusammensetzung kann bei der Wundheilung und Gewebewiederherstellung sowie bei der Heilung von Knochen-, Knorpel-, Bindegewebs-, Haut-, Schleim-

- 9 -

haut-, Epithelial- oder Zahnschädigungen und bei Zahnimplantaten entweder alleine oder in Kombination mit anderen Wirkstoffen, z.B. anderen Proteinen der TGF- β -Familie oder Wachstumsfaktoren, wie etwa EGF (epidermal growth factor) oder PDGF (platelet derived growth factor) verwendet werden. Pezner kann eine solche pharmazeutische Zusammensetzung bei der Krankheitsprävention, wie z.B. zur Prävention von Osteoporose und Arthrose verwendet werden.

Eine andere mögliche klinische Anwendung des erfindungsgemäßen TGF- β -artigen Proteins ist die Verwendung als Suppressor der Immunreaktion zur Vermeidung der Abstoßung von Organtransplantaten oder ein Einsatz im Zusammenhang mit der Angiogenese. Die erfindungsgemäße pharmazeutische Zusammensetzung kann auch prophylaktisch oder in der kosmetischen Chirurgie verwendet werden. Weiterhin ist die Anwendung der Zusammensetzung nicht auf Menschen beschränkt, sondern kann auch Tiere, insbesondere Haustiere umfassen.

Schließlich ist ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ein Antikörper, der spezifisch an die erfindungsgemäßen Proteine binden kann, oder ein derartiges Antikörperfragment (z.B. Fab oder Fab'). Verfahren zur Herstellung eines solchen spezifischen Antikörpers oder Antikörperfragmente gehören zum allgemeinen Fachwissen des Durchschnittsfachmanns. Vorzugweise ist ein solcher Antikörper ein monoklonaler Antikörper. Solche Antikörper oder Antikörperfragmente könnten sich auch für diagnostische Methoden eignen.

Weiterhin soll die Erfindung durch das folgende Beispiel veranschaulicht werden.

Beispiel 1

Isolierung von MF-52

1.1 Gesamt-RNA wurde aus menschlichem Embryonalgewebe (8 bis 9 Wochen alt) nach der Methode von Chirgwin et al.,

WO 95/04819

- 10 -

Biochemistry 18 (1979), 5294-5299 isoliert. Poly(A⁺)-RNA wurde aus der Gesamt-RNA durch Oligo (dT)-Chromatographie gemäß den Vorschriften des Herstellers (Strategene Poly (A) Quick-Säulen) abgetrennt.

- 1.2 Für die reverse Transkriptionsreaktion wurden 1 bis 2,5 µg Poly (A⁺)-RNA für 5 Minuten auf 65°C erhitzt und schnell auf Eis abgekühlt. Das Reaktionsgemisch enthielt 27 U RNA-Guard (Pharmacia), 2,5 µg Oligo (dT)12-18 (Pharmacia), 5 x Puffer (250 mmol/l Tris/HCl pH 8,5, 50 mmol/l MgCl₂, 50 mmol/l DTT, 5 mmol/l von jedem dNTP, 600 mmol/l KCl) und 20 U AMV reverse Transkriptase (Boehringer Mannheim) pro µg Poly (A⁺) RNA. Das Reaktionsgemisch (25 µl) wurde 2 Stunden lang bei 42°C inkubiert.
- 1.3 Die in Fig. 2 gezeigten Deoxynukleotidprimer OD und OID wurden auf einem automatischen DNA-Synthesizer (Bioscience) hergestellt. Die Reinigung erfolgte durch denaturierende Polyacrylamidgelektrophorese und Isolierung der Hauptbande aus dem Gel durch Isotachophorese. Die Oligonukleotide wurden durch Vergleich der Nukleinsäuresequenzen von bekannten Mitgliedern der TGF-β-Familie und Auswahl von Regionen mit der höchsten Konservierung entworfen. Ein Vergleich dieser Region ist in Fig. 2 gezeigt. Zur Erleichterung der Klonierung enthielten beide Nukleotide EcoRI-Restriktionsstellen und OD enthielt zusätzlich eine NcoI-Restriktionssstelle an seinem 5'-Terminus.
- 1.4 Bei der PCR-Reaktion wurde 20 ng Poly (A⁺) RNA entsprechende cDNA aus Ausgangsmaterial verwendet. Die Reaktion wurde in einem Volumen von 50 µl durchgeführt und enthielt 1 x PCR-Puffer (16,6 mmol/l (NH₄)₂SO₄, 67 mmol/l Tris/HCl pH 8,8, 2 mmol/l MgCl₂, 6,7 µmol/l EDTA, 10 mmol/l β-Mercaptoethanol, 170 µg/ml Rinderserumalbumin (Gibco), 200 µmol/l von jedem dNTP (Pharmacia), 30 pmol

- 11 -

von jedem Oligonukleotid (OD und OID) und 1,5 U Tag-Polymerase (AmpliTaq, Perkin Elmer Cetus). Das Reaktionsgemisch wurde mit Paraffin überschichtet und es wurden 40 PCR-Zyklen durchgeführt. Die Produkte der PCR-Reaktion wurden durch Phenol/Chloroform-Extraktion gereinigt und durch Ethanolpräzipitation konzentriert.

- 1.5 Das PCR-Reaktionsprodukt wurde mit den Restriktions-enzymen SphI (Pharmacia) und AlwNI (Biolabs) entsprechend den Vorschriften des Herstellers gespalten.
- 1.6 Die Produkte der Restriktionsspaltung wurden durch Agarosegelelektrophorese fraktioniert. Nach Anfärbung mit Ethidiumbromid wurden nicht gespaltene Amplifizierungsprodukte aus dem Gel herausgeschnitten und durch Phenolextraktion isoliert. Die erhaltene DNA wurde anschließend zweimal durch Phenol/Chloroform-Extraktion gereinigt.
- 1.7 Nach einer Ethanolpräzipitation wurde ein Viertel oder ein Fünftel der isolierten DNA reamplifiziert, wobei die gleichen Bedingungen wie für die primäre Amplifikation verwendet wurden, außer daß die Anzahl der Zyklen auf 13 verringert wurde. Die Reamplifizierungsprodukte wurden gereinigt, mit den gleichen Enzymen wie oben geschnitten und die ungeschnittenen Produkte wurden, wie oben für die Amplifizierungsprodukte erläutert, aus Agarosegelen isoliert. Der Reamplifizierungsschritt wurde zweimal wiederholt.
- 1.8 Nach der letzten Isolierung aus dem Gel wurden die Amplifizierungsprodukte durch 4 U EcoRI (Pharmacia) unter den vom Hersteller empfohlenen Bedingungen gespalten. Ein Viertel des Restriktionsgemisches wurde in den mit EcoRI gespaltenen Vektor pBluescriptII SK+ (Stratagene) ligiert. Nach Ligierung wurden 24 Klone durch Sequenzierung weiter analysiert. Dies mit AlwNI und SphI

- 12 -

gespaltene Probe ergab eine neue Sequenz, die als MP-52 bezeichnet wurde. Die anderen Klone enthielten überwiegend BMP6-Sequenzen und einer enthielt eine BMP7-Sequenz.

Der Klon wurde zum 3'-Ende der cDNA nach der ausführlich von Fröhmann (Amplifications, veröffentlicht von Perkin-Elmer Corp., Issue 5 (1990), pp 11-15) beschriebenen Methode vervollständigt. Die gleiche embryonale mRNA, die zur Isolierung des ersten Fragments von MP-52 verwendet worden war, wurde, wie oben beschrieben, revers transkribiert. Die Amplifizierung erfolgte unter Verwendung des Adapterprimers (AGAATTCQCATGCCATGGTCGACG) und eines inneren Primers (CTTGAGTACGAGGCTTCCACTG) der MP-52-Sequenz. Die Amplifizierungsprodukte wurden unter Verwendung eines überlappenden Adapterprimers (ATTCGCATGCCATGGTCGACGAAAG) und eines überlappenden internen Primers (GGAGCCCCACGAAATCATGCAGTCA) der MP-52-Sequenz reamplifiziert. Die Reamplifizierungsprodukte wurden nach Restriktionsspaltung mit NcoI in einen auf gleiche Weise gespaltenen Vektor (pUC 19 (Pharmacia Nr. 27-4951--01) mit einer geänderten multiplen Klonierungsstelle, die eine singuläre NcoI-Restriktionsstelle enthält) kloniert und sequenziert. Die Klone wurden durch ihre Sequenzüberlappung am 3'-Ende der bekannten MP-52-Sequenz charakterisiert. Einer davon wurde als Sonde zum Screening einer humanen genomischen Genbank (Stratagene Nr. 946203) nach einer ausführlich bei Ausubel et al. (Current Protocols in Molecular Biology, veröffentlicht von Greene Publishing Associates und Wiley-Interscience (1989)) beschriebenen Methode verwendet. Aus 8×10^5 λ Phagen wurde ein Phage (λ2.7.4) isoliert, der eine Insertion von etwa 20 kb enthält, und bei DSM unter der Hinterlegungsnummer 7387 hinterlegt. Dieser Klon enthält neben der aus mRNA durch die beschriebenen Amplifizierungsmethoden isolierte Sequenz weitere Sequenzinformationen am 5'-Ende.

- 13 -

Zur Sequenzanalyse wurde ein HindIII-Fragment von etwa 7,5 kb in einen auf gleiche Weise geschnittenen Vektor (Bluescript SK, Stratagene Nr. 212206) subkloniert. Dieses als SKL 52 (H3) MP12 bezeichnete Plasmid wurde ebenfalls bei DSM unter der Hinterlegungsnummer 7353 hinterlegt. Die in SEQ ID NO. 1 gezeigte Sequenzinformation stammt von dem Phagen λ 2.7.4.. Das ATG an Position 640 ist das erste ATG innerhalb des Leserahmens (bei Position 403 tritt ein Stoppkodon auf). Aufgrund der Sequenzdaten ist zu vermuten, daß es sich hierbei um das Startkodon für die Translation handelt.

Die genomische DNA enthält ein Intron von etwa 2 kb zwischen den Basenpaaren 1270 und 1271 von SEQ ID NO. 1. Die Sequenz des Introns ist nicht gezeigt. Die Richtigkeit der Splicesstelle wurde durch Sequenzierung eines Amplifizierungsprodukts bestätigt, das aus einer diese Region enthaltenden cDNA stammt. Diese Sequenzinformationen wurden mit Hilfe einer leicht modifizierten Methode erhalten, die ausführlich bei Froehman (Amplifications, veröffentlicht von Perkin-Elmer Corporation, Issue 5 (1990), pp 11-15) beschrieben ist. Es wurde die gleiche embryonale RNA, die auch zur Isolierung des 3'-Endes von MP-52 verwendet wurde, unter Einsatz eines internen, in 5'-Richtung orientierten Primers der MP-52-Sequenz (ACAGCAGGTGGTGGTGTGGACT) revers transkribiert. Ein PolyA-Schwanz wurde an das 5'-Ende des ersten cDNA-Strangs unter Verwendung terminaler Transferase angefügt. Es wurde eine 2-Schritt-Amplifizierung durchgeführt, zuerst durch Verwendung eines aus Oligo dT und einer Adaptersequenz bestehenden Primers (AGAATTCTGCATGCCATGGTCGACGAAGC(T16)) und zweitens eines Adapterprimers (AGAATTCTGCATGCCATGGTCGACG) und eines internen Primers (CCAGCAGCCCATCCTTCTCC) der MP-52-Sequenz durchgeführt. Die Amplifizierungsprodukte wurden unter Verwendung des gleichen Adapterprimers und eines überlappenden internen Primers (TCCAGGGCACTAATGTCAAACACCG) der MP-52-Sequenz reamplifiziert. Anschließend wurden die Reamplifizierungsprodukte unter Verwendung eines überlappenden Adapterprimers (ATTCGGCATGCCATGGTCGACGAAG) und eines über-

WO 95/04819

- 14 -

lappenden internen Primers (ACTAATGTCAAACACGTACCTCTG) der MP-52-Sequenz reamplifiziert. Die Reamplifizierungsprodukte wurden mit glatten Enden in einen Vektor (Bluescript SK, Stratagene Nr. 212206) kloniert, der mit EcoRV gespalten war. Die Klone wurden durch ihre Sequenzüberlappung mit der DNA von λ 2.7.4. charakterisiert.

Weiterhin wurde eine cDNA-Bank, hergestellt aus RNA von humanen Fibroblasten und kloniert in λ gt10, gescreent. Dabei wurden 2×10^6 Phagen getestet, wobei als radioaktive Sonde ein ca. 1 kb großes Fragment der genomischen MP-52-DNA (2. Exon bis zur HindIII-Restriktionsstelle im 3'-untranslatierten Bereich) diente. Es wurden 17 Mischplaques gepickt, die mit PCR unter Verwendung von Primern aus dem 5'- und 3'-Bereich der MP-52-Sequenz überprüft wurden. Daraufhin wurden 8 Phagenplaques ausgewählt und vereinzelt. Die cDNA wurde über eine EcoRI-Partialspaltung aus dem Phagen isoliert und in den ebenfalls mit EcoRI gespaltenen Bluescriptvektor kloniert.

Eine Sequenzierung eines der resultierenden Plasmide SK52L15.1MP25, zeigte, daß der längste Phage (15.1) bei Nukleotid Nr. 321 von SEQ ID NO. 1 beginnt. Weiterhin wurde durch das Sequenzieren die Splicesstelle (Nukleotid 1270) bestätigt.

Das Plasmid SKL 52 (H3) MP12 wurde unter der Hinterlegungsnummer 7353 bei DSM (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Mascheroder Weg 1b, 38124 Braunschweig) am 10. Dezember 1992 hinterlegt.

Der Phage λ 2.7.4 wurde unter der Hinterlegungsnummer 7387 bei DSM am 13. Januar 1993 hinterlegt.

Der Plasmid SK52L15.1MP25 wurde unter der Hinterlegungsnummer 8421 bei DSM am 16. Juli 1993 hinterlegt.

- 15 -

Beispiel 2

Expression von MP52

Für die Expression von MP52 wurden verschiedene Systeme getestet. Die Verwendung von Vaccinia Viren als Expressionsystem ist ausführlich und für den Fachmann nacharbeitbar in den Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel et al., Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience, Wiley & Sons) im folgenden abgekürzt mit CP unter Chapter 16 Unit 16.15-16.18 beschrieben. Das System beruht darauf, daß Fremd-DNA unter Verwendung bestimmter Vektoren durch homologe Rekombination in das Vaccinia Virus Genom integriert werden kann. Zu diesem Zweck enthält der verwendete Vektor das TK (Thymidinkinase)-Gen aus dem Vaccinia Genom. Um eine Selektion auf rekombinante Viren zu ermöglichen, enthält der Vektor weiterhin das E.coli-Xanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase-Gen (gpt) (Falkner et al., J. Virol. 62 (1988), 1849-1854). In diesen Vektor wurde die cDNA mit dem gesamten codierenden Bereich für MP52 kloniert. Die cDNA kommt aus dem Plasmid SK52L15.1MP25 (DSM, Hinterlegungsnummer 8421), welche zur Entfernung eines großen Teiles des 5'-nicht translatierten Bereichs aber zunächst deletiert und zwischenkloniert wurde. Dazu wurde das Plasmid SK52L15.1MP25 mit SalI linearisiert und stufenweise das 5'-Ende mit dem ExoIII/Mung Bean Kit (Stratagene #200330) nach Herstellerangaben deletiert. Nach Restriktion mit BamHI wurden die unterschiedlich weit deletierten MP52 cDNAs über ein Agarosegel von dem Restvektor getrennt, isoliert und nach Standardmethoden (Sambrook et al., Molecular Cloning, second edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989) in einem mit EcoRV und BamHI restriktierten pBluescriptII SK- Vektor (Stratagene #212206) zwischenkloniert (pSK52s). Sämtliche Restriktionen erfolgten nach Herstellerangaben. Ansequenzierung mit Sequenase (USB/Amersham #70770) ergab unter anderem einen Klon, der mit Nukleotid 576 in SEQ ID NO.1 (64 Basenpaare vom Startcodon entfernt) beginnt. Aus diesem wurde über SalI und SacI Restriktion das cDNA-Insert isoliert und in den ebenso gespal-

- 16 -

tenen Vektor für die Rekombination in Vaccinia kloniert. Das resultierende Plasmid (pBP1MP52s) wurde bei der DSM (Hinterlegungsnummer 9217) am 24. Mai 1994 hinterlegt und für die Herstellung von rekombinanten Vaccinia Viren eingesetzt. Dazu wurden zu 80 % konfluente 143B Zellen (HuTk-, ATCC CRL 8303) in 35 mm Kulturschalen mit Vaccinia Wildtyp Virus in 2 ml PBS für 30 Minuten bei Raumtemperatur unter gelegentlichem Schütteln infiziert (1 Virus auf 10 Zellen). Nach Absaugen des Überstandes und Zugabe von 2 ml Kulturmedium (MEM, Gibco BRL #041-01095) wurde für 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Das Medium wurde anschließend entfernt und die Transformation dieser Zellen mit 100 ng pBP1MP52s, 2 µg Träger DNA (Kalbs-thymus, Boehringer Mannheim #104175) und 10 µl Lipofektin (Gibco BRL #18292-011) in 1 ml MEM für 15 h bei 37°C erreicht. Nach Zugabe von 1 ml MEM mit 20 % FCS (Gibco BRL #011-06290) wurde für weitere 24 Stunden bei 37°C inkubiert und die lysierten Zellen anschließend eingefroren.

Die gpt Selektion auf die Xanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase und Isolation und Amplifizierung einzelner rekombinanter Viren erfolgte im wesentlichen wie in Unit 16.17 der CP beschrieben, mit dem Unterschied, daß RK13-Zellen (ATCC CCL 37) verwendet wurden.

Die Integration der MP52 cDNA in das Virus-Genom wurde durch Dot blot und Southern blot Analyse (CP Unit 16.18) bestätigt. Ein rekombinantes Virus wurde für Expressionsanalysen in der Zelllinie 143B (HuTk-, ATCC CRL 8303, human) eingesetzt. Die konfluenten Zellen wurden mit der der Zellzahl entsprechenden Anzahl an Viren für 45 Minuten bei 37°C infiziert und anschließend das entsprechende Kulturmedium (MEM, Gibco BRL #041-01095) mit 10 % FCS und Penicillin/Streptomycin (1:500, Gibco BRL #043-05140H) zugefügt. Nach 6 Stunden bei 37°C wurde das Medium entfernt, die Zellen zweimal mit z.B. HBSS (Gibco BRL #042-04180M) gewaschen und Produktionsmedium (z.B. MEM) ohne FCS zugesetzt. Nach 20 bis 22 Stunden Produktion wurde der Zellüberstand gesammelt. Die Analyse der Expression

- 17 -

erfolgte durch Western blots nach Standardmethoden (CP Unit 10.8). Dafür wurden die Proteine aus 100 bis 500 µl Zellkulturüberstand durch Zugabe des äquivalenten Volumens an Aceton und Inkubation von mindestens einer Stunde auf Eis präzipitiert und abzentrifugiert. Nach Resuspension des Pellets in Auftragspuffer (7 M Harnstoff, 1 % SDS, 7 mM Natriumdihydrogenphosphat, 0,01 % Bromphenolblau und gegebenenfalls 1 % β-Mercaptoethanol) erfolgte die Auftrennung in 15 %igen Polyacrylamidgelen. Als Markerproteine wurde ein vorgefärbter Protein-Molekulargewichtsstandard (Gibco BRL #26041-020) eingesetzt. Der Transfer auf PVDF-Membran (Immobilon #IPVH00010) und das Abblocken der Membran erfolgten nach Standardmethoden.

Zur Detektion von MP52 auf der Membran waren polyklonale Antikörper gegen MP52 sowohl in Hühnern als auch in Kaninchen erzeugt worden. Dazu wurde der reife Anteil von MP52 mit 6 Histidinen am N-Terminus in E.coli exprimiert und gereinigt, wie z.B. beschrieben in Hochuli et al. (BIO/Technology, Vol. 6, 1321-1325 (1988)). Mit beiden Antikörpern ist es möglich, spezifisch Expression von MP52 nachzuweisen, wobei dimeres MP52 weniger effizient erkannt wird als monomeres. Für den Western blot in Figur 3 wurden Hühner-Antikörper verwendet, die über PEG-Präzipitation (Thalley et al., BIO/Technology Vol. 8, 934-938 (1990)) und über Membran-gebundenes Antigen (reifes MP52 mit 6 Histidinen) (18.17 in Sambrook et al., Molecular Cloning, second edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989) spezifisch gereinigt waren. Als zweiter Antikörper wurde Anti-Chicken IgG mit gekoppelter alkalischer Phosphatase (Sigma A9171) eingesetzt. Die Detektion erfolgte mit dem Tropix Western-Light Protein Detection Kit (Serva #WL10RC) nach Herstellerangaben.

Der Western blot in Figur 3 zeigt, daß nur bei den rekombinanten Viren, nicht aber bei den Wildtyp Viren (ohne integrierte Fremd-DNA) MP52 spezifische Banden auftreten. Die Expression von MP52 führt zu einem sekretierten Protein mit

- 18 -

einem im Gel unter nicht reduzierenden Bedingungen erscheinenden Molekulargewicht von ungefähr 25 kDa. Unter reduzierenden Bedingungen läuft das Protein bei 14 bis 15 kDa im Gel. Diese Ergebnisse zeigen, daß MP52 als dimeres reifes Protein exprimiert wird. Bei den im Western blot auftretenden schwachen Banden im Bereich oberhalb von 60 kDa handelt es sich wahrscheinlich um Reste von ungeschnittenen Vorläuferproteinen. Das Laufverhalten bestätigt zudem die aus SEQ ID NO.2 abzuleitenden theoretischen Molekulargewichte, wonach reifes, monomeres MP52 eine Größe von 13.6 kDa besitzt.

Die Expression von MP52 und Spaltung des Vorläuferproteins zum reifen MP52 ist nachweislich in verschiedenen Zelllinien möglich. Getestet wurden C127 (ATCC CRL 1616, Maus), BHK21 (ATCC CCL 10, Hamster), MRC-5 (ATCC CCL 171, Mensch) und 3T6-Swiss albino (ATCC CCL 96, Maus) Zellen.

Expression und Spaltung zum reifen MP52 wurde auch in einem weiteren eukaryontischen Expressionssystem gezeigt. Dafür wurde die cDNA von MP52 (beginnend mit Nukleotid 576) in das Expressionsplasmid pSGS (Stratagene #216201) kloniert. Das Plasmid pSK52s wurde mit *Cla*I und *Xba*I restriktiert und durch T4-Polymerasebehandlung die überhängenden Enden des MP52-Inserts stumpf gemacht. Die Klonierung in den mit EcoRI restriktierten und durch T4-Polymerasebehandlung ebenfalls stumpfendigen Vektor pSGS erfolgte nach Standardmethoden. Alle enzymatischen Reaktionen erfolgten nach Herstellerangaben. Die korrekte Orientierung des MP52-Inserts wurde durch Restriktionsanalyse und Ansequenzierung mit dem T7-Primer (Stratagene #300302) abgesichert. Das resultierende Plasmid pSG52s (am 17.05.94 bei der DSM mit der Hinterlegungsnummer DSM 9204 hinterlegt) kann mit einem Vektor, der für einen selektierbaren Marker kodiert, wie z.B. das Gen für G418^r, transformiert werden, um stabile Zelllinien zu erhalten. Zu diesem Zweck wurde pSG52s mit dem Plasmid p3616 (am 17.05.94 bei der DSM mit der Hinterlegungsnummer DSM 9203 hinterlegt) in L929 Zellen (ATCC CCL1, Maus) mit Lipofektin

- 19 -

(Gibco BRL #18292-011) nach Herstellerangaben kotransformiert. Die Selektion mit G418 erfolgte nach dem Fachmann bekannten Methoden (CP, unit 9.5) und führte zu einer Zelllinie, die im Western blot nachweisbar reifas MP52 produziert.

Ein weiterer Expressionsvektor für MP52 wurde unter Verwendung des Plasmides pABWN (Niwa et al., Gene 108 (1991), 193-200 und Figur 4), das von Dr. Miyazaki zur Verfügung gestellt wurde, hergestellt.

Dazu wurde das Hind III Fragment aus dem Plasmid pSK52s, das mit dem Nukleotid 576 in SEQ ID NO. 1 beginnt, isoliert und die überhängenden Enden durch Behandlung mit Klenow Fragment stumpfendig gemacht. Durch Ligation des Adapters wurde an beiden Fragmentenden eine Not I Restriktionsschnittstelle eingeführt.

Adapter: AGCGGGCOGCT
TCGCCGGCGA

Der Vektor pABWN wurde mit Xho I restriktiert, ebenfalls mit dem Klenow Fragment behandelt und mit der intestinalen Alkalischen Phosphatase vom Kalb (Boehringer Mannheim) dephosphoryliert. Derselbe phosphorylierte Adapter wurde anligiert, so daß nun eine Insertion des MP52-Fragments nach Restriktion mit Not I in die generierte Not I Schnittstelle des Vektors möglich war. Der resultierende Expressionsvektor wird nachfolgend als Hind III-MP52/pABWN bezeichnet. Alle durchgeführten Reaktionen für die Klonierung erfolgten nach Standardmethoden (z.B. CP unit 3.16).

Die Struktur des Hind III-MP52/pABWN Expressionsvektors wurde durch Sequenzierung und Restriktionskartierung bestätigt. Hind III-MP52/pABWN enthält die MP52-Sequenz beginnend mit Nukleotid 576 und endend mit Nukleotid 2278 in SEQ ID NO. 1.

HindIII-MP52/pABWN wurde in L-Zellen (Maus-Fibroblasten) transfiziert, und es wurden daraus stabile Transformanten etabliert. Dazu wurden jeweils 4 µg der Plasmide (Hind III-MP52/pABWN oder pABWN) in 5 x 10⁵ L-Zellen auf einer 6 cm Kulturschale unter Verwendung von 20 µl LipofectAMINE Reagenz (Gibco BRL #18324-012) transfiziert. Dazu wurde Lösung A (4 µg der jeweiligen Plasmid DNA in 200 µl OPTI-MEM I (Gibco BRL # 31985)) vorsichtig gemischt mit Lösung B (20 µl LipofectAMINE Reagenz in 200 µl OPTI-MEM I) und bei Raumtemperatur für 45 Minuten zur Bildung des DNA-Liposomen Komplexes inkubiert. Während dessen wurden die Zellen einmal mit 2 ml OPTI-MEM I gewaschen. Für jede Transfektion wurden 1,6 ml OPTI-MEM I zu dem Gefäß mit dem DNA-Liposomen

- 20 -

Komplex gegeben. Die Lösung wurde vorsichtig gemischt und damit die gewaschenen Zellen überschichtet. Die Zellen wurden mit dem verdünnten Komplex für 5 Stunden bei 37°C im CO₂ Inkubator inkubiert. Nach der Inkubation wurden 2 ml DMEM (Gibco BRL, Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium) / 20% FCS zugegeben. 24 Stunden nach der Transfektion wurde das Medium mit frischem DMEM/10% FCS ersetzt. 48 Stunden nach Beginn der Transfektion wurden die Zellen in eine 10 cm Kulturschale überführt. 72 Stunden nach Beginn der Transfektion wurde die G418 Selektion mit einer Konzentration von 800 µg/ml begonnen. Die stabilen Klone erschienen nach 1 bis 2 Wochen.

5 ml konditioniertes DMEM mit oder ohne FCS wurde von konfluenten Transformanten erhalten, die 3 Tage in einer 10 cm Kulturschale gewachsen waren. Die 2 verschiedenen Zellkulturüberstände (HindIII-MP52/pABWN und pABWN) transfizierter Zellen sowie Zellysate wurden im Western blot untersucht. Dabei wurde reifes MP52 in konditioniertem Medium sowie in Zellysaten von HindIII-MP52/pABWN transfizierten Zellen gefunden. Die Klone wurden weiterkloniert und MP52 produzierende Zellen jeweils nach Western blot Analyse ausgewählt. Abschätzungen aus Western blot Analysen ergaben MP52 Produktion von bis zu 1 mg/l.

Beispiel 3:

Biologische Aktivität von MP52

Um die biologische Aktivität von MP52 nachzuweisen und die Nützlichkeit dieser Erfindung für medizinische Anwendungen zur Vermeidung und/oder Behandlung von Knochenkrankheiten zu belegen, wurden mehrere Experimente *in vitro* und *in vivo* durchgeführt.

1. *In vitro* assays

1.1

Da eine Steigerung der Glykosaminoglykan (GAG) Synthese in Chondrozyten nach TGF-β Stimulation beschrieben ist (Kiraki et al., Biochimica et Biophysica Acta 969 (1988), 91-99), wurde untersucht, ob MP52 ebenfalls diesen Einfluß ausübt. Unter Verwendung der Zellkulturüberstände (DMEM mit 10% FCS) von MP52 produzierenden L-Zelltransformanten (transfiziert mit Hind III-

- 20 -

Komplex gegeben. Die Lösung wurde vorsichtig gemischt und damit die gewaschenen Zellen überschichtet. Die Zellen wurden mit dem verdünnten Komplex für 5 Stunden bei 37°C im CO₂ Inkubator inkubiert. Nach der Inkubation wurden 2 ml DMEM (Gibco BRL, Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium) / 20% FCS zugegeben. 24 Stunden nach der Transfektion wurde das Medium mit frischem DMEM/10% FCS ersetzt. 48 Stunden nach Beginn der Transfektion wurden die Zellen in eine 10 cm Kulturschale überführt. 72 Stunden nach Beginn der Transfektion wurde die G418 Selektion mit einer Konzentration von 800 µg/ml begonnen. Die stabilen Klone erschienen nach 1 bis 2 Wochen.

5 ml konditioniertes DMEM mit oder ohne FCS wurde von konfluenten Transformanten erhalten, die 3 Tage in einer 10 cm Kulturschale gewachsen waren. Die 2 verschiedenen Zellkulturüberstände (HindIII-MP52/pABWN und pABWN) transfizierter Zellen sowie Zellysate wurden im Western blot untersucht. Dabei wurde reifes MP52 in konditioniertem Medium sowie in Zellysaten von HindIII-MP52/pABWN transfizierten Zellen gefunden. Die Klone wurden weiterkloniert und MP52 produzierende Zellen jeweils nach Western blot Analyse ausgewählt. Abschätzungen aus Western blot Analysen ergaben MP52 Produktion von bis zu 1 mg/l.

Beispiel 3:

Biologische Aktivität von MP52

Um die biologische Aktivität von MP52 nachzuweisen und die Nützlichkeit dieser Erfindung für medizinische Anwendungen zur Vermeidung und/oder Behandlung von Knochenkrankheiten zu belegen, wurden mehrere Experimente *in vitro* und *in vivo* durchgeführt.

1. *In vitro* assays

1.1

Da eine Steigerung der Glykosaminoglykan (GAG) Synthese in Chondrozyten nach TGF-β Stimulation beschrieben ist (Hiraki et al., Biochimica et Biophysica Acta 969 (1988), 91-99), wurde untersucht, ob MP52 ebenfalls diesen Einfluß ausübt. Unter Verwendung der Zellkulturüberstände (DMEM mit 10% FCS) von MP52 produzierenden L-Zelltransformanten (transfiziert mit Hind III-

- 20 -

Komplex gegeben. Die Lösung wurde vorsichtig gemischt und damit die gewaschenen Zellen überschichtet. Die Zellen wurden mit dem verdünnten Komplex für 5 Stunden bei 37°C im CO₂ Inkubator inkubiert. Nach der Inkubation wurden 2 ml DMEM (Gibco BRL, Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium) / 20% FCS zugegeben. 24 Stunden nach der Transfektion wurde das Medium mit frischem DMEM/10% FCS ersetzt. 48 Stunden nach Beginn der Transfektion wurden die Zellen in eine 10 cm Kulturschale überführt. 72 Stunden nach Beginn der Transfektion wurde die G418 Selektion mit einer Konzentration von 800 µg/ml begonnen. Die stabilen Klone erschienen nach 1 bis 2 Wochen.

5 ml konditioniertes DMEM mit oder ohne FCS wurde von konfluenten Transformanten erhalten, die 3 Tage in einer 10 cm Kulturschale gewachsen waren. Die 2 verschiedenen Zellkulturüberstände (HindIII-MP52/pABWN und pABWN) transfizierter Zellen sowie Zellysate wurden im Western blot untersucht. Dabei wurde reifes MP52 in konditioniertem Medium sowie in Zellysaten von HindIII-MP52/pABWN transfizierten Zellen gefunden. Die Klone wurden weiterkloniert und MP52 produzierende Zellen jeweils nach Western blot Analyse ausgewählt. Abschätzungen aus Western blot Analysen ergaben MP52 Produktion von bis zu 1 mg/l.

Beispiel 3:

Biologische Aktivität von MP52

Um die biologische Aktivität von MP52 nachzuweisen und die Nützlichkeit dieser Erfindung für medizinische Anwendungen zur Vermeidung und/oder Behandlung von Knochenkrankheiten zu belegen, wurden mehrere Experimente *in vitro* und *in vivo* durchgeführt.

1. *In vitro* assays

1.1

Da eine Steigerung der Glykosaminoglykan (GAG) Synthese in Chondrozyten nach TGF-β Stimulation beschrieben ist (Hiraki et al., Biochimica et Biophysica Acta 969 (1988), 91-99), wurde untersucht, ob MP52 ebenfalls diesen Einfluß ausübt. Unter Verwendung der Zellkulturüberstände (DMEM mit 10% FCS) von MP52 produzierenden L-Zelltransformanten (transfiziert mit Hind III-

- 20 -

Komplex gegeben. Die Lösung wurde vorsichtig gemischt und damit die gewaschenen Zellen überschichtet. Die Zellen wurden mit dem verdünnten Komplex für 5 Stunden bei 37°C im CO₂ Inkubator inkubiert. Nach der Inkubation wurden 2 ml DMEM (Gibco BRL, Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium) / 20% FCS zugegeben. 24 Stunden nach der Transfektion wurde das Medium mit frischem DMEM/10% FCS ersetzt. 48 Stunden nach Beginn der Transfektion wurden die Zellen in eine 10 cm Kulturschale überführt. 72 Stunden nach Beginn der Transfektion wurde die G418 Selektion mit einer Konzentration von 800 µg/ml begonnen. Die stabilen Klone erschienen nach 1 bis 2 Wochen.

5 ml konditioniertes DMEM mit oder ohne FCS wurde von konfluenten Transformantien erhalten, die 3 Tage in einer 10 cm Kulturschale gewachsen waren. Die 2 verschiedenen Zellkulturüberstände (HindIII-MP52/pABWN und pABWN) transfigizierte Zellen sowie Zelllysate wurden im Western blot untersucht. Dabei wurde reifes MP52 in konditioniertem Medium sowie in Zelllysaten von HindIII-MP52/pABWN transfigizierten Zellen gefunden. Die Klone wurden weiterkloniert und MP52 produzierende Zellen jeweils nach Western blot Analyse ausgewählt. Abschätzungen aus Western blot Analysen ergaben MP52 Produktion von bis zu 1 mg/l.

Biologische Aktivität von MP52

Um die biologische Aktivität von MP52 nachzuweisen und die Nützlichkeit dieser Erfindung für medizinische Anwendungen zur Vermeldung und/oder Behandlung von Knochenkrankheiten zu belegen, wurden mehrere Experimente *in vitro* und *in vivo* durchgeführt.

1. *In vitro* assays

1.1

Da eine Steigerung der Glykosaminoglykan (GAG) Synthese in Chondrozyten nach TGF-β Stimulation beschrieben ist (Hiraki et al., Biochimica et Biophysica Acta 969 (1988), 91-99), wurde untersucht, ob MP52 ebenfalls diesen Einfluß ausübt. Unter Verwendung der Zellkulturüberstände (DMEM mit 10% FCS) von MP52 produzierenden L-Zelltransformantien (transfiziert mit Hind III-

- 21 -

MP52/pABWN), wurde die chondrogene Aktivität von MP52 in Primärkulturen aus fötalen Rattenextremitäten getestet.

Dazu wurden die vier Extremitäten von 16-Tage alten Rattenföten verwendet. Nach Trypsinierung wurden die gewonnenen Zellen in F-12 Medium (Nutrient Mixture Ham's F-12, Gibco BRL #21700) mit 10% FCS auf Kollagen-Typ I beschichteten 24-Well Platten mit 3×10^3 Zellen ausplattiert und ca. 2 Tage bis zur Konfluenz kultiviert. Zu 500 µl Kulturmedium (F-12 Medium mit 10% FCS) wurden jeweils 56 µl konditioniertes Medium (KM) von HindIII-MP52/pABWN-L-Zelltransfektanten, von pABWN-L-Zelltransfektanten oder nur Medium (DMEM mit 10% FCS) gegeben. Über einen Zeitraum von 0, 3, 6 und 9 Tagen wurde F-12 Medium mit 10% FCS sowie den entsprechenden Zusätzen verwendet. Alle drei Tage erfolgte ein Wechsel des Mediums mit den entsprechenden Zusätzen. Danach wurde die Kultur für weitere 2 Tage in F-12 Medium ohne FCS in Anwesenheit der entsprechenden Zusätze (konditionierte Medien bzw. Kontrollmedium) kultiviert und dann ^{35}S -Sulfat für 6 Stunden zugesetzt. In Polysaccharide inkorporiertes ^{35}S wurde nach Pronase E Verdau und Präzipitation wie in Hiraki et al. (Biochimica et Biophysica Acta 969 (1988), 91-99) beschrieben, gemessen.

Tabelle 1:

Anzahl der Inkubationstage	Radioaktivität (cpm/well)		
	DMEM (10%PCS) von Kontroll-L- Zellen	KM von pABWN- L-Zelltransfektan- ten	KM von HindIII- MP52/pABWN-L- Zelltransfektanten
2	3720±114	3865±120	4879±422
5	4188±155	4154±29	8223±275*
8	3546±160	3310±115	9890±1260*
11	3679±218	3633±167	7520±160*

Werte basieren sich auf \pm S.E.M. für 3 oder 4 Kultursätze

*: $p < 0,01$ vs DMEM und KM von pABWN-L-Zelltransfektanten (Scheffe's multiple t-test)

Wie in Tabelle 1 gezeigt, stimulieren die Zellkulturüberstände der MP52 produzierenden Transfektanten signifikant die GAG Synthese im Vergleich zu reinem Kulturmedium (DMEM mit 10% FCS) oder dem Zellkulturüberstand

- 22 -

von pABWN-transfizierten L-Zellen. Dies zeigt, daß MP52 die Chondrozytendifferenzierung stimulieren kann.

1.2

Ein beschriebener Effekt für einige Mitglieder der BMP-Familie ist die Steigerung der alkalische Phosphatase (ALP)-Aktivität in Osteoblasten. Die klonale Ratten-Zelllinie ROB-C26 (C-26) zählt zu den Osteoblasten eines relativ frühen Reifestadiums (Yamaguchi et al., Calcif. Tissue Int. 49 (1991), 221-225). Für osteoinduktive Proteine wie z.B. das BMP-2 ist die Fähigkeit zur Steigerung der ALP-Aktivität bei Yamaguchi et al. (J. Cell Biol. 113 (1991), 681-687) beschrieben.

Der Einfluß von MP52 auf C26-Zellen wurde wie folgt untersucht: Die C26-Zellen wurden mit 3×10^4 Zellen pro Well in eine 24-Well Platte ausgesät und in α-MEM (Gibco BRL) / 10% FCS bis zur Konfluenz kultiviert. Pro Well wurden 56 µl des Zellkulturüberstandes von MP52 produzierenden L-Zelltransfektanten (Hind III-MP52/pABWN) bzw. Zellkulturüberstand von pABWN-L-Zelltransfektanten oder nur Zellkulturüberstand (DMEM mit 10% FCS) von L-Zellen zu 500 µl des C-26 Zellkulturmediums gegeben. Ein Mediumwechsel mit den entsprechenden Zusätzen erfolgte alle drei Tage. Die ALP-Aktivität in den Zellextrakten wurde nach 0, 3, 6, 9 und 12 Tagen mit Hilfe von Standardtechniken basierend auf p-Nitrophenyl-Phosphat als Substrat, wie z.B. beschrieben bei Takuwa et al. (Am. J. Physiol. 257 (1989), E797-E803), bestimmt.

Tabelle 2:

ALP-Aktivität (nmol/min) pro Well

Anzahl der Inkubationstage	DMEM (10%FCS) von Kontroll-L-Zellen	KM von pABWN-L-Zelltransfektanten	KM von HindIII-MP52/pABWN-L-Zelltransfektanten
0	41,8±2,8	41,8±2,8	41,8±2,8
3	136,3±3,7	125,8±2,3	181,3±14,2*
6	129,0±7,8	119,3±6,4	258,0±8,3*
9	118,4±3,7	110,1±2,8	258,4±10,6*
12	121,2±3,2	125,3±6,0	237,8±11,0*

Werte beziehen sich auf ± S.D. für 4 Kultursätze

*: p<0,01 vs DMEM und KM von pABWN-L-Zelltransfektanten (Scheffe's multiple t-test)

Wie in Tabelle 2 gezeigt wird, steigt die ALP-Aktivität durch die MP52 Zugabe signifikant im Vergleich zu reinem DMEM/10%FCS Medium und Medium von pABWN-infizierten L-Zellen an. Dieses Ergebnis zeigt, daß MP52 nicht nur die Chondrozyten Differenzierung, sondern auch Osteoblasten Differenzierung und Relfung bewirken kann.

Eine weitere Osteoblastenzelllinie (MC3T3-E1, Maus), die wie bei Takuwa et al. (Biochem. Biophys. Res. Com. 174 (1991), 96-101) beschrieben durch BMP-2 Behandlung einen Anstieg der ALP-Aktivität zeigt, gibt nach Inkubation mit konditioniertem Medium von MP52 produzierenden L-Zelltransfektanten (Hind III-MP52/pABWN) oder Medium nach MP52 Produktion durch Infektion mit rekombinanten Vaccinia Viren keine Veränderung der ALP-Aktivität. Dies weist darauf hin, daß MP52 z.T. eine von BMP-2 abweichende Zellspezifität besitzt. Unterschiedliche Funktionen bedingt durch verschiedene Zielorte für die einzelnen TGF- β Familienmitglieder können von großer medizinischer Relevanz sein.

2. In vivo Experimente

2.1

Die aussagekräftigste Möglichkeit Knochenentwicklung zu untersuchen, basiert auf der ektopischen Knochenbildung *in vivo*. Diese kann z.B. durch Implantation von entmineralisierter Knochenmatrix induziert werden (Urist, Science 150 (1965), 893-899). Durch Kombination von inaktiver Matrix mit knocheninduzierenden Proteinen kann der gleiche Prozess induziert werden, wie es z.B. beschrieben ist bei Sampath et al. (PNAS 78 (1981), 7599-7603). Dieser Knochenbildungsprozeß gleicht dem der embryonalen enchondralen Knochenbildung und der adulten Knochenheilung. Somit bietet diese Methode die Möglichkeit, Proteine auf ihre Fähigkeit zur Knocheninduktion *in vivo* zu untersuchen. * Proc.Natl.Acad.Sci. USA

Für ein solches Experiment wurde MP52 Protein, welches durch Expression im Vaccinia System (siehe Beispiel 2) gewonnen wurde, teilgereinigt und implantiert.

Dazu wurden 143B Zellen (HuTk-, ATCC CRL 5303) in Kulturschalen und Rollerflaschen bis zur Konfluenz angezogen und, wie in Beispiel 2 für Expressionsanalysen beschrieben, mit rekombinanten Viren infiziert, gewaschen und für ungefähr 20 Stunden MP52 in MEM (Gibco BRL, ca. 1 ml pro 10^6 Zellen) akkumulieren gelassen. Als Kontrolle erfolgte der gleiche Ansatz durch Infektion mit Wildtyp Viren. Zellkulturüberstand (konditioniertes Medium) von jedem Ansatz wurde gesammelt und

zentrifugiert ($40000 \times g$ für 30 Minuten bei 4°C). Zur Entfernung der Viren wurden die Überstände über anorganische Filter ($0.1 \mu\text{m}$ Porengröße, Whatman, Anotop 25) filtriert. Im Verlauf der Charakterisierung von MP52 konnte gezeigt werden, daß dieses Protein an Heparin Sepharose bindet. Dieses Verhalten wurde für eine Teilreinigung ausgenutzt. Dazu wurde das filtrierte und zentrifugierte, konditionierte Medium auf eine Endkonzentration von 50 mM Tris pH 7.0, 100 mM NaCl und 6 M Harnstoff gebracht und auf eine Heparin Säule (HiTrapTM, Pharmacia 417-0407-01), die equilibriert war in Puffer A (50 mM Tris pH 7.0, 100 mM NaCl und 6 M Harnstoff), geladen. Die beladene Säule wurde mit Puffer A gewaschen und mit einem linearen Gradienten nach 100 % Puffer B (50 mM Tris pH 7.0, 600 mM NaCl und 6 M Harnstoff) bei einer Durchflußrate von 0.5 ml/min innerhalb von 50 min eluiert (2,5 ml pro Fraktion). Die Verwendung von Harnstoff ist nicht zwingend. Über Western blot Analyse (siehe Beispiel 2) konnte überprüft werden, daß MP52 reproduzierbar hauptsächlich in 2 Fraktionen bei ungefähr 250 bis 400 mM NaCl eluiert. Aliquots dieser Fraktionen wurden ebenfalls in nach Herstellerangaben mit Silber gefärbten 15%igen Polyacrylamidgelen (Silver Stain-II, Daiichi #SE140000) überprüft und die Fraktionen gepoolt. Die vergleichbaren Fraktionen nach Reinigung von konditioniertem Medium nach Infektion mit Wildtyp-Viren wurden nach Analyse in mit Silber gefärbten Gelen ebenfalls gepoolt.

Aus weiteren Untersuchungen zu MP52 ergab sich, daß MP52 auch an Hydroxyapatit bindet. Deshalb ist es prinzipiell möglich, eine zusätzliche Reinigung durch eine Hydroxyapatitsäule zu erreichen, bzw. eine Heparinsäule durch eine Hydroxyapatitsäule (z.B.: BIO-RAD, Econo-pac HTP) zu ersetzen. Denkbar sind für weitere Aufreinigungen auch andere dem Fachmann bekannte Methoden wie z.B. Gelsiebsäulen, Ionenaustauschersäulen, Affinitätsäulen, Metallchelatsäulen oder Säulen basierend auf hydrophobe Wechselwirkungen.

Das über Heparin Sepharose Chromatographie vorgereinigte MP52 Protein bzw. die entsprechend noch kontaminierenden Proteine, die sich auch in den Wildtyp infizierten Zellkulturrüberständen befinden, wurden weiter mit Hilfe einer Reversed Phase HPLC aufgereinigt. Dazu wurde eine C8-Säule (Aquapore RP300, Applied Biosystems, Partikelgröße: $7\mu\text{m}$, Porengröße: 300\AA) equilibriert mit 10% Puffer B (Puffer A: 0,1% Trifluoressigsäure; Puffer B: 90% Acetonitril, 0,1% Trifluoressigsäure). Nach Beladung der Säule mit den gepoolten, MP52 enthaltenden Fraktionen der Heparinsäule wurde ausgiebig mit 10% Puffer B gewaschen. Das gebundene Protein wurde mit folgendem Gradienten eluiert: 10 bis 50% Puffer B über 20 Minuten und 50 bis 100% Puffer B über 50 Minuten. Fraktionen zu $500 \mu\text{l}$ wurden gesammelt und sowohl im Western blot als auch in mit Silber gefärbten Gelen analysiert. Das MP52 Protein eluiert unter den gewählten Bedingungen ungefähr im Bereich von 55 bis 65 % Acetonitril. Die Fraktionen mit MP52 wurden gepoolt. Das gleiche erfolgte mit den korrespondierenden Fraktionen aus der Kontrollreinigung von Zellkulturrüberstand der mit Wildtyp-Viren infizierten Zellen.

- 25 -

Auch teilgereinigtes MP52-Protein zeigte in einer nach Western blot Analyse abgeschätzten Konzentration von 50 ng/ml eine deutliche Steigerung der ALP-Aktivität auf ROB-C26-Zellen nach drei Inkubationsstagen.

Teilgereinigtes MP52-Protein bzw. Kontrollprotein aus den entsprechend teil gereinigten Zellkulturüberständen nach Wildtyp-Viren-Infektion wurden mit Matrix rekonstituiert und in Ratten implantiert, um die Fähigkeit zur Knorpel- und Knochenbildung unter Beweis zu stellen.

Prinzipiell sollten verschiedene dem Fachmann bekannte Matrixmaterialien verwendbar sein, d.h. natürliche (auch modifizierte) und synthetisch hergestellte Matrices, bevorzugt sind aber biokompatible, *in vivo* biologisch abbaubare poröse Materialien. In diesen Experimenten wurde Knochenmatrix von Ratten verwendet, die im wesentlichen ähnlich wie bei Sampath et al. (PNAS 80 (1983), 6591-6595) beschrieben präpariert wurde. Die Rattenknochen (Femur und Tibia) wurden in 0,6 M HCl für 24 Stunden entmineralisiert und anschließend noch vorhandenes Knochenmark entfernt. Nach Waschen mit Wasser und dreistündigem Entfetten in einem Chloroform/Methanol (1/1) Gemisch wurden die Knochen luftgetrocknet, tiefgefroren in einer Mühle pulverisiert und Partikelgrößen zwischen 400 bis 1000 µm herausgesiebt. Anschließend wurde die Matrix für 7 Tage bei Raumtemperatur in 4 M Guanidinium-HCl in Gegenwart von Proteaseinhibitoren extrahiert. Nach extensivem Waschen mit Wasser wurde die Matrix lyophilisiert und bei 4°C aufbewahrt. So behandelte Matrices zeigen alleine keine knocheninduzierende Aktivität mehr.

Protein kann über verschiedene dem Fachmann bekannte Methoden mit der extrahierten Knochenmatrix kombiniert werden.
MP52-Protein bzw. Kontrollprotein, das sowohl über Heparin Sepharose als auch Reversed Phase HPLC gereinigt war, wurde in der Acetonitril/Trifluoressigsäure Lösung nach Elution mit je 25 mg Matrix pro Implantat vereinigt, gut gemischt, tiefgefroren und lyophilisiert.

Für die Implantation von matrixgebundenem MP52 wurden zwei ca. 3 Monate alte Ratten (Whistar) verwendet, die durch intramuskuläre Injektion eines Narkosierungsmittels (0,2 ml Rompun (Bayer) gemischt mit 0,5 ml Ketanest 50 (Parke Davis)) mit 0,14 ml pro 100 g Körpergewicht betäubt worden waren. Für die Implantate wurden bilateral Taschen in der Bauchmuskulatur (unterhalb des Thorax, beginnend ca. 0,5 cm unterhalb des untersten Rippenbogens) präpariert. Das matrixgebundene MP52 (ca. 2 bis 4 µg nach Abschätzung auf Western blots) sowie die entsprechend matrixgebundenen Kontrollproteine wurden mit 0,9 %iger Kochsalzlösung (Delta Pharma) angefeuchtet und in die Muskeltaschen überführt. Die Muskeltaschen sowie die notwendigen Hautschnitte wurden anschließend vernäht. Die Ratten wurden mit Cyclosporin A (Sandimmun) immunsupprimiert. Nach 18 bzw. nach 26 Tagen wurden die Implantate aus den Ratten entnommen und für histologische Untersuchungen fixiert. Da das Implantat mit MP52 nach 26 Tagen bereits makroskopisch die Bildung von Knochen vermuten ließ, wurde dieses zur Anfertigung von Dünnschnitten in Methylmethacrylat eingebettet, die anderen Implantate wurden in Paraffin

eingebettet. Mineralisierte Knorpel- und Knochengewebe werden durch die von Kossa Färbetechnik (Romeis, B.; Mikroskopische Technik, Bd: Böck, P.; Urban und Schwarzenberg; München, Baltimore, Wien (1989)) schwarz hervorgehoben. Bei der Trichromfärbung nach Masson-Goldner (Romeis, B.; Mikroskopische Technik, Ed: Böck, P.; Urban und Schwarzenberg; München, Baltimore, Wien (1989)) wird mineralisiertes Knochengewebe und Kollagen leuchtend grün gefärbt, Osteoid ist rot und Zytosplasma rödlich-braun. Beide Färbetechniken wurden auf die Implantate aus beiden Ratten angewendet. Mit beiden Färbetechniken konnte in beiden Versuchstieren deutliche Knorpel- und Knochenbildung in den Implantaten, die MP52 enthalten, nachgewiesen werden. Die korrespondierenden Implantate mit Kontrollprotein zeigten keinerlei Knorpel- oder Knochenbildung. Der Anteil an Knorpelvorstufen mit Chondrozyten und Knorpelarealen mit beginnender Bildung von Extrazellulärmatrix und deren Mineralisierung in konzentrischen Kreisen ist in dem MP52 Implantat nach 18 Tagen höher als in dem von 26 Tagen. Aber auch in dem Implantat nach 18 Tagen sind bereits reifes Knochengewebe mit vektorieller Osteoidbildung sowie einzelne Osteocyten im Knochen nachweisbar. Weiterhin sind geschlossene Ossikel mit beginnender Knochenmarksbildung erkennbar. Bei dem Implantat nach 26 Tagen sind auch noch Knorpelareale mit beginnender Matrixbildung und Kalzifizierung nachweisbar, der Anteil an dem grün gefärbten mineralisierten Knochengewebe mit Osteocyten und Osteoidzäpfchen hat jedoch deutlich zugenommen. Auch in diesem Implantat ist Knochenmarksbildung mit vereinzelten Fettzellvorkommen nachweisbar. Zur Veranschaulichung zeigt Figur 5 den farberischen Nachweis (von Kossa) des Knochenmaterials vom Gesamimplantat nach 26 Tagen. In Figur 6 ist ein kleiner Ausschnitt desselben Implantates nach Masson-Goldner Färbung gezeigt. Es zeigt aktiven Knochen mit einem Saum aus kuboidalen Osteoblasten und Osteoid in dem einzelne eingemauerte Osteoblasten erkennbar sind. Des weiteren sind einzelne Osteocyten im mineralisierten Knochengewebe (im Originalpräparat grün angefärbt) sichtbar. Die Knochenmarkbildung ist ebenfalls nachweisbar.

Der Versuch zeigt, daß rekombinant erzeugtes MP52 alleine, in Kombination mit einer Matrix, in der Lage ist enchondrale Knochenbildung zu induzieren.

2.2

Zur Bestätigung der Ergebnisse wurde ein weiterer ektopischer Knochenbildungstest unter Verwendung der MP52 L-Zelltransformanten durchgeführt. MP52 produzierende (Hind III-MP52/pABWN transfizierte) und nicht-produzierende (pABWN transfizierte) L-Zellen (1×10^6 Zellen) wurden in die beidseitige Schenkelmuskulatur von je drei männlichen Nacktmäusen injiziert. Nach drei Wochen wurden alle Tiere getötet, die Schenkelmuskulatur abgetrennt und diese sowohl mit niedrigenergetischer Röntgenstrahlung als auch histopathologisch untersucht.

WO 95/04819

- 27 -

Wie in Tabelle 3 aufgelistet, zeigt die Röntgenstrahlanalyse dichtes Material an den Injektionsstellen im Muskelgewebe aller MP52-produzierenden L-Zellen. Mit histologischen Untersuchungen konnte einfache Knorpelbildung und kalzifizierte Knorpelbildung in den Muskeln festgestellt werden. Auch diese Ergebnisse bestätigen, daß MP52 enchondrale Knochenbildung induzieren kann.

Tabelle 3:

	MP52 produzierende Zellen (HindIII-MP52/pABWN)	Kontrollzellen (pABWN)
dichtes Material bei Röntgenanalyse	3/3	0/3
Chondrocyten bei Histologie	3/3	0/3
Kalzifizierende Knorpelbildung bei Histologie	3/3	0/3

Die durchgeführten Experimente bestätigen, daß MP52 Protein die Bildung von Knorpel aus unendifferenzierten Mesenchymzellen, sowie die Differenzierung und Reifung von Osteoblasten stimuliert. Dies führt zu einer enchondralen Knochenbildung, die der Induktionskaskade bei der embryonalen Knochenbildung und der Knochenheilung bei Frakturen gleicht.

Die in den Versuchen aufgeführten Bedingungen sind als Illustration der MP52 Aktivität und nicht als Begrenzung zu betrachten. Die Erfahrung kann auch in anderer Form untersucht und charakterisiert werden.

Für die in der Anmeldung genannten Zelllinien und Plasmide sind als Anlage die Hinterlegungsbescheinigungen beigelegt, aus denen die Hinterlegungsaangaben ersichtlich sind.

- 37 -

PATENTANSPRÜCHE

1.4 DNA-Molekül, das für ein Protein der TGF- β -Familie codiert und

- (a) den für das reife Protein codierenden Anteil und gegebenenfalls weitere funktionelle Anteile der in SEQ ID NO. 1 gezeigten Nukleotidsequenz,
- (b) eine der Sequenz aus (a) im Rahmen der Degeneration des genetischen Codes entsprechende Nukleotidsequenz,
- (c) einem allelischen Derivat einer der Sequenzen aus (a) und (b) entsprechende Nukleotidsequenz, oder
- (d) eine mit einer der Sequenzen aus (a), (b) oder (c) hybridisierende Nukleotidsequenz umfaßt unter der Voraussetzung, daß ein DNA-Molekül gemäß (d) zumindest den für ein reifes Protein der TGF- β -Familie codierenden Anteil vollständig enthält.

2. Vektor,
dadurch gekennzeichnet,
daß er mindestens eine Kopie eines DNA-Moleküls nach Anspruch 1 enthält.

3. Wirtszelle,
dadurch gekennzeichnet,
daß sie mit einer DNA nach Anspruch 1 oder einem Vektor nach Anspruch 2 transformiert ist.

4. Wirtszelle nach Anspruch 3,
dadurch gekennzeichnet,
daß sie ein Bakterium, ein Pilz, eine pflanzliche oder eine tierische Zelle ist.

5. Protein der TGF- β -Familie, das von einer DNA-Sequenz nach Anspruch 1 codiert wird.

- 6.) Protein nach Anspruch 5,
durch gekennzeichnet,
daß es die in SEQ ID NO. 2 gezeigte Aminosäuresequenz
oder gegebenenfalls funktionelle Anteile davon aufweist.
- 7.) Verfahren zur Herstellung eines Proteins der TGF- β -Familie,
durch gekennzeichnet,
daß man eine Wirtszelle nach Anspruch 3 oder 4 kulti-
viert und das TGF- β -Protein aus der Zelle oder/und dem
Kulturüberstand gewinnt.
- 8.) Pharmazeutische Zusammensetzung,
durch gekennzeichnet,
daß sie mindestens ein Protein nach Anspruch 5 oder 6
als Wirkstoff gegebenenfalls zusammen mit pharmazeutisch
üblichen Träger-, Hilfs-, Verdünnungs- oder Füllstoffen
enthält.
- 9.) Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 8 zur
Behandlung oder Prävention von Knochen-, Knorpel-, Bin-
degewebs-, Haut-, Schleimhaut-, Epithelial- oder Zahns-
chädigungen, zur Anwendung bei Zahnimplantaten und zur
Anwendung in Wundheilungs- und Gewebewiederherstellungs-
prozessen.
- 10.) Antikörper oder Antikörperfragmente,
durch gekennzeichnet,
daß sie an ein Protein nach Anspruch 5 oder 6 binden.

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.